

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/ES05/000171

International filing date: 01 April 2005 (01.04.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: ES
Number: P200400826
Filing date: 02 April 2004 (02.04.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 27 May 2005 (27.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE DE INVENCIÓN número P 200400826, que tiene fecha de presentación en este Organismo el 2004-04-02.

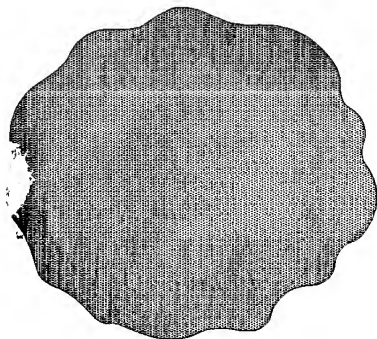
INDICACIÓN DE PRIORIDAD: El código del país con el número de su solicitud de prioridad, que ha de utilizarse para la presentación de solicitudes en otros países en virtud del Convenio de París, es: ES 200400826.

Madrid, 9 de Mayo de 2005

El Director del Departamento de Patentes
e Información Tecnológica

P.D.

ANA Mª REDONDO MÍNGUEZ





MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

INSTANCIA DE SOLICITUD

NUMERO DE SOLICITUD

2200400826

4 1 1 1

FECHA Y HORA DE PRESENTACIÓN EN LA O.E.P.M.

FECHA Y HORA PRESENTACIÓN EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(4) LUGAR DE PRESENTACIÓN:

CÓDIGO

Madrid

28

(1) MODALIDAD:

☒ PATENTE DE INVENCION

☐ MODELO DE UTILIDAD

(2) TIPO DE SOLICITUD:

☐ ADICIÓN A LA PATENTE

☐ SOLICITUD DIVISIONAL

☐ CAMBIO DE MODALIDAD

☐ TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA

☐ PCT: ENTRADA FASE NACIONAL

(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:

MODALIDAD

Nº SOLICITUD

FECHA SOLICITUD

(5) SOLICITANTE (S): APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO PAÍS

DNI/CIF

CNAE

PYME

ITALFARMACO, S.A.

Española

ES

A-78570611

244

4

(6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE:

DOMICILIO C/ San Rafael, 3

LOCALIDAD Alcobendas

PROVINCIA Madrid

PAÍS RESIDENCIA España

NACIONALIDAD Española

TELÉFONO 91 657 23 23

FAX 91 657 23 60

CORREO ELECTRÓNICO bbanfi@itfsp.com

CÓDIGO POSTAL 28108

CÓDIGO PAÍS ES

CÓDIGO PAÍS ES

(7) INVENTOR (ES):

APELLIDOS

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO

MOSCO DEL PRADO
CHANTRES ANTORANZ

JAIME
JOSÉ RAMÓN

Española
Española

PAÍS
ES
ES

(8)

☐ EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR

☒ EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O ÚNICO INVENTOR

(9) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:

☒ INVENC. LABORAL

☐ CONTRATO

☐ SUCESIÓN

(10) TÍTULO DE LA INVENCION:

FORMULACIONES LIPOSOMALES

(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:

☐ SI

☒ NO

(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR

FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:

PAÍS DE ORIGEN

CÓDIGO
PAÍS

NÚMERO

FECHA

(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/86 DE PATENTES

☐

(15) AGENTE /REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CÓDIGO) (RELLENAR, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES)

(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:

☒ DESCRIPCIÓN Nº DE PÁGINAS: 16

☒ Nº DE REIVINDICACIONES: 18

☒ DIBUJOS. Nº DE PÁGINAS: 4

☐ LISTA DE SECUENCIAS Nº DE PÁGINAS:

☒ RESUMEN

☐ DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN

☒ JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASA DE SOLICITUD

☐ HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

☐ PRUEBAS DE LOS DIBUJOS

☐ CUESTIONARIO DE PROSPECCIÓN

☒ OTROS: DECLARACIÓN ADQUISIÓN DERECHOS

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE

Saverio Scialdone
Consejero Delegado
(VER COMUNICACIÓN)

FIRMA DEL FUNCIONARIO

NOTIFICACIÓN SOBRE LA TASA DE CONCESIÓN:

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 2245/1986.

ILMO. SR. DIRECTOR DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

informacion@oepm.es

www.oepm.es

C/ PANAMÁ, 1 • 28071 MADRID

MOD. 3101i - 1 - EJEMPLAR PARA EL EXPEDIENTE

NO CUMPLIMENTAR LOS RECUADROS ENMARCADOS EN ROJO



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

HOJA DE INFORMACION COMPLEMENTARIA

NÚMERO DE SOLICITUD

1020

FECHA DE PRESENTACIÓN

☐ PATENTE DE INVENCION

☐ MODELO DE UTILIDAD

(5) SOLICITANTES:

APELLIDOS O
DENOMINACIÓN SOCIAL

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO
PAÍS

DNI/CIF

CNAE

PYME

(7) INVENTORES:

APELLIDOS

NOMBRE

NACIONALIDAD

ELORZA BARROETA
ELORZA BARROETA
CÓRDOBA DÍAZ

MARÍA ÁNGELES
BEGOÑA
MANUEL

Española
Española
Española

(12) EXPOSICIONES OFICIALES:

LUGAR

FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:

PAÍS DE ORIGEN

CÓDIGO
PAÍS

NÚMERO

FECHA



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

NÚMERO DE SOLICITUD

P200400326

FECHA DE PRESENTACIÓN

RESUMEN Y GRÁFICO

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

Formulaciones de 5-fluorouracilo encapsulado en liposomas, útiles en la prevención o el tratamiento de enfermedades o condiciones del ser humano o animal asociadas a hiperproliferación celular.

GRÁFICO



12

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

| | |
|----|-----------------------------------|
| 21 | NÚMERO DE SOLICITUD |
| 22 | FECHA DE PRESENTACIÓN |
| 62 | PATENTE DE LA QUE ES DIVISORIA |

| | | | | | | |
|----|---|--------------------|---|-------|----|------|
| 31 | NÚMERO | DATOS DE PRIORIDAD | 32 | FECHA | 33 | PAÍS |
| 71 | SOLICITANTE (S) ITALFARMACO, S.A. DOMICILIO C / San Rafael, 3 - 28108 Alcobendas (Madrid) - ESPAÑA NACIONALIDAD Española | | | | | |
| 72 | INVENTOR (ES) MOSCOSO DEL PRADO, JAIME; CHANTRES ANTORANZ, JOSÉ RAMÓN; ELORZA BARROETA, MARÍA ÁNGELES; ELORZA BARROETA, BEGOÑA; CÓRDOBA DÍAZ, MANUEL | | | | | |
| 51 | Int. Cl. | | GRÁFICO (SÓLO PARA INTERPRETAR RESUMEN) | | | |
| 54 | TÍTULO DE LA INVENCION FORMULACIONES LIPOSOMALES | | | | | |
| 57 | RESUMEN Formulaciones de 5-fluorouracilo encapsulado en liposomas, útiles en la prevención o el tratamiento de enfermedades o condiciones del ser humano o animal asociadas a hiperproliferación celular. | | | | | |

FORMULACIONES LIPOSOMALES

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La invención se refiere a formulaciones de 5-fluorouracilo encapsulado en liposomas, al método de encapsulación del 5-fluorouracilo en los liposomas y al uso de dichas formulaciones en terapia y prevención de enfermedades y/o trastornos del ser humano o animal.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- El 5-fluoro-2,4(1H,3H)-pirimidindiona (5-fluorouracilo o 5-FU), es un conocido fármaco antineoplásico, perteneciente al grupo de antimetabolitos. Es utilizado en el tratamiento de enfermedades o condiciones relacionadas con hiperproliferación celular tales como distintos tipos de cáncer o de condiciones precancerosas, por ejemplo queratosis actínica. Suele ser administrado por vía parenteral o tópica.

- El 5-FU interfiere con la proliferación celular patológica, produciendo eventualmente la destrucción de las células implicadas. No obstante, también puede alterar el crecimiento de células normales y, en consecuencia, suele producir efectos indeseados.

- 20 Cuando es administrado por vía parenteral puede causar efectos adversos a nivel hemático (mielosupresión), gastrointestinal (estomatitis, diarrea, náuseas y vómitos), dérmico (eritrodisestesia palmar-plantar), ocular (lacrimación excesiva), etc. Cuando es aplicado en forma tópica suele producir irritación, foto-sensibilización y necrosis.

- En consecuencia, existe la necesidad de formulaciones farmacéuticas o veterinarias de 5-FU que produzcan menos efectos adversos, manteniendo su eficacia. Una forma de lograr este objetivo es encapsular el 5-FU en liposomas.

30

Los liposomas son vesículas submicroscópicas que poseen una cavidad central acuosa rodeada por una membrana lipídica formada por bicapa(s) concéntrica(s).

- Los liposomas pueden ser unilamelares (es decir tener una única bicapa lipídica) u oligolamelares o multilamelares. Las vesículas multilamelares (MLVs) tienen un tamaño que va desde 0,2 μm a 10 μm mientras que las unilamelares pueden ser grandes (LUVs) o pequeñas (SUVs) con un tamaño desde 0,02 a 0,2 μm .

Por su estructura tienen capacidad de incorporar sustancias hidrofílicas (en el interior acuoso) o hidrofóbicas (en la membrana lipídica). El 5-FU es un compuesto hidrofílico (con una solubilidad en agua de 12,2 mg/mL a 25°C) y prácticamente insoluble en disolventes orgánicos (con un coeficiente de reparto octanol/agua de 0,1). Por tanto, su interacción con la bicapa lipídica será muy escasa y estará localizado en el interior acuoso de los liposomas.

Los componentes estructurales más importantes de los liposomas son los fosfolípidos (PL). Para obtener liposomas con propiedades específicas se pueden utilizar fosfolípidos con carga neutra, positiva o negativa y con diferente longitud y grado de saturación de las cadenas de ácidos grasos.

Asimismo, para modificar las propiedades de los liposomas se puede, por ejemplo, incorporar colesterol u otros lípidos a la membrana, modificar el número de bicapas lipídicas o unir covalentemente polímeros naturales o sintéticos a su superficie.

En suma, las variables a considerar en el momento de diseñar un liposoma son múltiples y los resultados no son siempre los esperados.

Como vehículos para la administración de fármacos, los liposomas tienen, en teoría, numerosas ventajas. Además de estar constituidos por componentes no tóxicos, generalmente no inmunogénicos, no irritantes y biodegradables, deberían ser capaces de encapsular, transportar y ceder a órganos diana una gran variedad de agentes terapéuticos, reduciendo sus efectos secundarios adversos.

Sin embargo, numerosos estudios han demostrado que el objetivo de desarrollar formulaciones liposomales óptimas desde el punto de vista técnico y terapéutico es alcanzado en contadas ocasiones.

En particular, las vesículas liposomales óptimas deben ser capaces de:

- encapsular el agente activo en su interior en un porcentaje elevado, de modo que la eficacia de encapsulación (relación entre cantidad de fármaco encapsulado y lípido) sea adecuada desde el punto de vista de la dosificación y del costo de la formulación;
- ser estables, es decir retener el agente activo encapsulado durante la vida útil de la formulación y una vez administradas al paciente, hasta alcanzar el sitio de acción;
- liberar el fármaco en el sitio de acción con un perfil de cesión adecuado al objetivo terapéutico, reduciendo la toxicidad sistémica.

Por otra parte, y en el caso específico de administración tópica, los lípidos que forman las vesículas liposomales deben conferir ciertas propiedades a la bicapa lipídica de modo que los liposomas resultantes promuevan la rápida penetración del principio activo a través del stratum corneum y su localización en el sitio de acción deseado (normalmente las proximidades de la capa basal de la epidermis).

- Si bien se ha conseguido la encapsulación de 5-FU en liposomas, la retención del agente activo en el interior de los mismos continúa siendo un problema técnico a solucionar como queda demostrado en diferentes estudios.
- Así, Simmons SP, Kramer PA. [*J Pharm Sci* 66: 984-986 (1977)], utilizando liposomas multilamelares compuestos por esfingomieline, colesterol y dicetilfosfato encuentran que, al cabo de 40 horas a 25°C, únicamente 20% de 5-FU inicialmente encapsulado se mantiene en el interior de los liposomas.
- Tsukada K, Ueda S, Okada R. [*Chem. Pharm. Bull.* 32: 1912-1935 (1984)], empleando liposomas compuestos por DSPC encuentran que, seis horas después de su preparación, se ha producido una salida de 5-FU del interior de las vesículas de 50% y 10%, respectivamente, a 37 y 25°C.
- Özer AY [*Drug Target. Deliv.* 1: 15-160 (1992)], estudia el comportamiento de liposomas tipo OLV de dos composiciones: a) lecitina de soja : hemisuccinato de colesterol : colesterol (10:1:4) y b) DPPC : hemisuccinato de colesterol: colesterol (10:1:4). La capacidad de retención del fármaco que refieren es reducida, pero depende de la formulación probada. En los liposomas tipo a) únicamente 10% de 5-FU permanece retenido en su interior después de 28 días a temperatura ambiente. En los liposomas tipo b) 40% de 5-FU sale en 42 días a temperatura ambiente.
- Fresta M, Villari A, Publisi G, Cavallaro G [*Int. J. Pharm.* 99:145-156 (1993)], empleando liposomas de diferente tamaño y distintas composiciones estudian su capacidad de retención durante 7 horas a 37 °C. Según tipo y composición de los mismos, encuentran que en ese espacio de tiempo sale de los liposomas entre 15% y 35% de 5-FU inicialmente retenido.
- Por su parte, Elorza B, Elorza MA, Frutos G, Chantres JR. [*BBA* 1153: 135-142 (1993).], utilizando liposomas LUV con dos composiciones diferentes constituidas por DSPC y esfingomieline, respectivamente, estudian la salida de 5-FU de su interior durante 60 minutos. En ese tiempo, más de 75% sale de los liposomas de DSPC y entre 12 y 25 % de los de SM.

El Maghraby GMM, Williams AC, Barry BW. J Pharm Pharmacol 53: 1069-1077 (2001), empleando liposomas LUV con tres composiciones diferentes: SPC; SPC:Coolesterol. (1:1) y SPC:Colato (84:16), encuentran una rápida salida de 5-FU (más de 50% a los 50 minutos), a pesar de encontrarse suspendidos en una solución saturada de 5-FU. Por otra parte, al suspender liposomas compuestos por SPC:Colato en una solución sin 5-FU, una salida de 80% de 5-FU inicialmente encapsulado a los 5 minutos.

Finalmente, Mayer LD, Bally MB, Cullis PR, Ginsberg RS, Mitlenes GN, US Patent 6.083.530 (2000) plantean resolver dos problemas conocidos: aumentar la encapsulación y conseguir que drogas antineoplásicas permanezcan retenidas en los liposomas. Usan diferentes composiciones con y sin coolesterol. Las vesículas son de tipo LUV y los fármacos son cargados activamente mediante gradiente de pH. De esta manera obtienen alto porcentaje de encapsulación y logran retener el principio activo en el interior de los liposomas. No obstante, al eliminar el gradiente de pH la salida de la droga es inmediata. Entre los ejemplos que presentan este comportamiento se encuentra una formulación de 5-FU.

RESUMEN DE LA INVENCION

Existe por lo tanto la necesidad de disponer de formulaciones de 5-FU liposomal que tengan alta eficacia de encapsulación de 5-FU, estabilidad y al mismo tiempo que posean un perfil de cesión del fármaco adecuado al objetivo terapéutico y no sean tóxicas para el paciente.

Los inventores de la presente han encontrado que el empleo de una mezcla de fosfolípidos saturados neutros y de lípidos saturados con carga en la preparación de los liposomas permite alcanzar los objetivos planteados en el párrafo anterior, tal como se expone en los Ejemplos 1 a 8.

En particular, han logrado obtener formulaciones estables de 5-FU liposomal, es decir formulaciones en las que el principio activo permanece encapsulado en el interior de los liposomas durante el tiempo necesario para la preparación, almacenamiento y distribución de las correspondientes formulaciones farmacéuticas hasta la administración al paciente.

Asimismo, y para el caso específico de la aplicación tópica, han conseguido que dichas formulaciones tengan una buena difusión en piel, alcanzando la epidermis y teniendo allí un efecto depot, y no manifiesten signos de toxicidad (irritación cutánea) tras su aplicación dérmica reiterada. Cabe esperar que también muestren

buena difusión en mucosas.

En suma, el uso de una combinación de PL saturados neutros y lípidos saturados con carga permite obtener composiciones tópicas de 5-FU liposomal que tienen alta estabilidad, eficacia (basada en una buena difusión cutánea del fármaco) y seguridad (debida a una baja absorción sistémica).

En consecuencia, un primer aspecto de la presente invención está relacionado con formulaciones de 5-FU liposomal que comprenden el principio activo encapsulado en liposomas constituidos por una o varias bicapas de una mezcla de fosfolípidos saturados neutros y lípidos saturados con carga.

Un segundo aspecto de la presente invención está relacionado con un procedimiento de preparación de dichas formulaciones de 5-FU liposomal.

Un tercer aspecto de la presente invención está relacionado con el uso de las formulaciones de 5-FU liposomal en la preparación de medicamentos para el tratamiento de enfermedades o condiciones relacionadas con hiperproliferación celular, por ejemplo psoriasis, condiloma acuminado, distintos tipos de cáncer o condiciones precancerosas (tales como queratosis actínica o displasia cervical) en el ser humano o animal.

Un cuarto aspecto de la presente invención está relacionado con las formulaciones farmacéuticas o veterinarias que contienen dichas formulaciones de 5-FU liposomal y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Previo a la descripción de las realizaciones particulares, cabe definir algunos términos específicos vinculados a los aspectos principales de la presente invención, con fines aclaratorios, no limitativos.

Se entiende por formulación de 5-FU liposomal a aquella en la que una parte o la totalidad del 5-FU se encuentra encapsulado en el interior de liposomas.

Los liposomas pueden estar constituidos por una o varias bicapas de lípidos y tener diferente tamaño.

Las bicapas tienen superficie polar (interior y exterior) y núcleo no polar.

Se entiende por fosfolípido a aquel derivado anfifílico del glicerol en el que uno de sus grupos hidroxilo está esterificado con ácido fosfórico y los otros dos hidroxilos están esterificados con ácidos grasos de cadena larga.

5 Un fosfolípido saturado será aquel cuyos ácidos grasos no tengan dobles enlaces carbono-carbono.

Un fosfolípido neutro será generalmente aquel en el que otro hidroxilo del ácido fosfórico está esterificado por un alcohol sustituido con un grupo polar (habitualmente hidroxilo o amino) y cuya carga neta es cero.

10 Un fosfolípido con carga será generalmente aquel en el que otro hidroxilo del ácido fosfórico está esterificado por un alcohol sustituido por un grupo polar y cuya carga neta es positiva o negativa.

Se entiende que lípido saturado con carga, además de incluir a los fosfolípidos saturados con carga, comprende a otros compuestos anfifílicos cuya carga neta es distinta de cero, tales como derivados hidrocarbonados de cadena larga, 15 sustituidos por un grupo polar (por ejemplo amino) y derivados de ácidos grasos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 En principio, cualquier PL saturado neutro y cualquier lípido saturado con carga pueden ser utilizados en las formulaciones de 5-FU liposomal de la presente invención.

25 En una realización preferida, los PL saturados neutros son elegidos del grupo formado por derivados de fosfatidilcolina y sus mezclas, por ejemplo dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y sus mezclas.

30 En otra realización preferida, los PL saturados con carga se seleccionan del grupo formado por derivados de fosfatidilglicerol, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico y sus mezclas, por ejemplo, diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG) y una mezcla de ésteres de fosfatidilserina con diferentes ácidos grasos saturados (PS de cerebro bovino).

35 En otra realización particular, el lípido saturado con carga es estearilamina (SA).

En principio, cualquier relación entre PL neutros y lípidos con carga puede ser utilizada en las formulaciones de esta invención.

En una realización preferida, la relación molar PL neutros / lípidos con carga estará entre 50/50 y 95/5, preferentemente entre 80/20 y 95/5.

5

Dos formulaciones de 5-FU liposomal particularmente preferidas son las que comprenden liposomas constituidos por la mezcla de fosfolípidos DSPC-DSPG y DSPC-PS de cerebro bovino, con una relación PL neutro / PL con carga entre 85/15 y 95/5.

10

En las formulaciones liposomales de esta invención la relación molar 5-FU / lípidos puede estar entre 0,2 y 1,5, preferentemente entre 0,5 y 1,0.

El límite inferior viene determinado por la menor cantidad de 5-FU que resulte práctica para hacer liposomas dado su pretendido uso y puede ser fácilmente determinado por un experto en la materia. El límite superior está condicionado por la concentración de cristalización del 5-FU.

15

Las formulaciones de 5-FU liposomal proporcionadas por esta invención pueden además contener otros componentes lipídicos como esteroides (por ejemplo colesterol) o esfingolípidos (por ejemplo esfingomielina).

20

5-FU, PL y demás componentes de las formulaciones de la presente invención pueden ser obtenidos de fuentes comerciales. Por ejemplo, DSPG y DSPC fueron obtenidos de Chemi S.p.A., PS de cerebro bovino y 5-FU de Sigma.

25

Las formulaciones de 5-FU liposomal de la presente invención pueden ser preparadas por cualquiera de los métodos conocidos por un experto en la materia.

El tamaño de los liposomas resultantes va a depender del método de preparación empleado. En una realización preferida los liposomas son preparados de acuerdo

30

al método expuesto en los Ejemplos 1 y 4.

Los liposomas resultantes pueden ser deshidratados (liofilizados) para su posterior formulación y/o almacenamiento y distribución.

Por otra parte, los liposomas pueden mantenerse en suspensión en una solución acuosa que contiene o no 5-FU. En el primer caso, la suspensión resultante

35

contendrá parte del fármaco encapsulado en el interior de los liposomas y parte en el exterior de los mismos.

En el caso de administración tópica son preferidas las formulaciones de 5-FU liposomal con parte del principio activo en fase externa, tales como las descritas en los Ejemplos 4 y 5. En estas formulaciones, el porcentaje en peso de 5-FU encapsulado en el interior de los liposomas respecto a la cantidad de 5-FU total
5 estará entre 20% y 100%, preferentemente entre 35% y 55%

Las formulaciones de 5-FU liposomal de la presente invención van a ser útiles en la preparación de composiciones farmacéuticas o veterinarias para el tratamiento de enfermedades o condiciones relacionadas con hiperproliferación celular, por
10 ejemplo distintos tipos de cáncer, condiciones precancerosas u otras patologías del ser humano o animal.

Los distintos tipos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama, colorectal, gástrico, pancreático, de vejiga urinaria, de próstata, de cabeza y
15 cuello, de ovario, cervical, endometrial, hepático, de pulmón, carcinoma de células basales superficiales, etc.

Las lesiones precancerosas incluyen, por ejemplo, queratosis actínica, displasia cervical, etc.

Otras patologías asociadas a hiperproliferación celular incluyen, a modo de
20 ejemplo, psoriasis, condiloma cuminado, etc.

Las formulaciones de 5-FU liposomal proporcionadas por esta invención han demostrado ser particularmente útiles y ventajosas en tratamientos por vía tópica de enfermedades o condiciones hiperproliferativas de piel y mucosas tales como
25 las mencionadas en el párrafo anterior.

En la mayoría de los casos, las formulaciones liposomales de la presente invención se administrarán en un vehículo farmacéuticamente aceptable, que va a estar constituido por al menos un excipiente. Dicho excipiente puede ser
30 seleccionado entre cualquiera de los conocidos por un experto en la materia y de acuerdo con la vía de administración a emplear, la que dependerá del objetivo terapéutico buscado.

Para la administración parenteral, el vehículo suele estar constituido por agua y sustancias auxiliares requeridas para hacerlo compatible con las condiciones
35 fisiológicas tales como agentes reguladores de pH, de tonicidad, etc. La solución acuosa resultante puede ser esterilizada por métodos convencionales y envasada

para su uso, o filtrada y liofilizada, lo que puede requerir el uso de agentes crioprotectores. El material liofilizado será combinado con una solución acuosa estéril previo a su administración.

5 Para la administración tópica, el vehículo va a estar constituido por excipientes seleccionados de acuerdo con la forma farmacéutica que se pretenda en cada caso, preferiblemente líquida o semisólida. Las formulaciones líquidas incluyen soluciones acuosas, soluciones hidroalcohólicas, lociones, etc. Las formulaciones semisólidas van a ser mayoritariamente pomadas, cremas o geles.

10 Cualquiera de éstas puede requerir el empleo de conservantes, agentes antioxidantes, quelantes, sistemas reguladores de pH, conservantes, polímeros bioadhesivos, etc.

El agente conservante puede ser seleccionado entre, por ejemplo, benzoato de sodio, ácido ascórbico, parabenos y sus mezclas. El antioxidante puede ser
15 elegido, a modo de ejemplo, entre hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisol y tocoferol y sus derivados. El agente quelante puede ser seleccionado, por ejemplo, del grupo formado por EDTA, EGTA y ácido cítrico o sus sales. El sistema regulador de pH puede ser elegido, a modo de ejemplo, entre una solución tampón fosfato y una solución tampón citrato.

20

Las dosis de principio activo a administrar al paciente va a depender de la indicación terapéutica de la formulación, de la respuesta del paciente al tratamiento y de la terapia concomitante.

25 ENSAYOS

Las propiedades inesperadas y ventajosas de las formulaciones de la presente invención se manifiestan a través los siguientes ensayos "in-vitro" e "in-vivo" no limitativos.

30

Métodos de Preparación y Ensayos de Estabilidad

Ejemplo 1 (liposomas con DSPC/DSPG y sin 5-FU en fase externa)

Se añaden a un matraz de rotavapor los siguientes componentes:

| | | |
|----|------|--------|
| 35 | DSPC | 384 mg |
| | DSPG | 43 mg |

Perlas de vidrio 4.5 g
 Cloroformo:metanol (2:1) 9 ml

Una vez disueltos los lípidos en la mezcla de solventes, el matraz se conecta al rotavapor, ajustando la temperatura del baño a 40°C, y se evapora el disolvente a presión reducida (800 mbar) hasta formar una película de lípidos en las paredes del matraz. Posteriormente se reduce la presión 100 mbar y se mantiene durante 1 hora. Finalmente, el matraz se retira del rotavapor y se liofiliza durante toda la noche para eliminar posibles trazas de disolvente orgánico. La película de lípidos así formada se hidrata agitando con 9 ml de una solución acuosa de 5-FU (50 mg/ml, pH 8.8) a 65°C durante 1 hora. Posteriormente se mantiene en agitación una hora adicional a 30°C.

La suspensión liposómica formada se extruye a través de filtros de policarbonato de 2 µm de poro para homogeneizar el tamaño de las vesículas formadas. Finalmente, la suspensión resultante se diafiltra frente a 6 volúmenes de un tampón fosfato salino (pH 6; 600 mOsmol/Kg). Para ello se utilizan membranas Vivaflow 50 con un corte de 100KD (Sartorius). Los liposomas resultantes se diluyen con el mismo tampón, se alicuotan en viales de polipropileno y se almacenan a 25°C hasta su análisis.

Para determinar el 5-FU total presente en la suspensión liposómica se diluye previamente la suspensión en metanol para disolver los lípidos de la membrana liposómica y liberar su contenido. La concentración de 5-FU se determina mediante espectroscopia a 266 nm frente a una curva de calibración.

Para determinar el fluorouracilo encapsulado, se sedimentan previamente los liposomas mediante centrifugación durante 25 minutos a 26.000 g, recogiendo el sobrenadante. Posteriormente se analiza el contenido de 5-FU en el sobrenadante por el procedimiento anteriormente descrito.

La diferencia entre el 5-FU tal y el presente en el sobrenadante representa la fracción encapsulada. En el ejemplo descrito, la concentración de 5-FU total se ajustó a 0.800 mg/ml, estando un 95.5% del mismo encapsulado en el interior de los liposomas al comienzo del estudio. La relación molar 5-FU/lípido fue de 0,82.

La Figura 1 muestra la evolución del porcentaje de 5-FU encapsulado (expresado en porcentaje respecto al inicial) a lo largo de un total de 6 meses a 25°C. Se

observa una caída inicial del porcentaje de 5-FU encapsulado, estabilizándose posteriormente en el 67% (I.C. 95% = 61 – 73)

Ejemplo 2 (liposomas con DSPG/PS y sin 5-FU en fase externa)

- 5 Se realiza de forma análoga al ejemplo 1, sustituyendo DSPG por PS como fosfolípido cargado negativamente.

La Figura 2 muestra la evolución del porcentaje de encapsulación (expresado en porcentaje respecto al inicial) a lo largo de un total de 6 meses.

- 10 En este caso, la concentración de 5-FU total se ajustó a 0,600 mg/ml, con un 96.5 % encapsulado inicialmente, y una relación molarFU/lípido de 0,7 La cinética es similar a la observada en el ejemplo anterior, produciéndose una estabilización en el 71% de encapsulación (C.I. 95% = 66 – 75)

- 15 **Ejemplo 3** (liposomas con DSPC/DSPG y con parte de 5-FU de fase externa eliminado)

- Se procede de manera análoga al ejemplo 1 pero realizando la diafiltración únicamente frente a 3 volúmenes de tampón, de forma que no se elimina completamente el 5-FU no encapsulado. La suspensión de liposomas se diluye
20 hasta una concentración de 5-FU total de 3.41 mg/ml, el 71% del cual está encapsulado en el interior de los liposomas, con una relación molar 5-FU/lípido de 1,5. El seguimiento de la estabilidad se realiza durante dos meses.

- Los resultados se muestran en la Figura 3. En estas condiciones, no se detecta
25 ninguna caída significativa en el porcentaje de encapsulación a lo largo de los dos meses estudiados.

Ejemplo 4 (liposomas en tampón citrato con DSPC/DSPG y sin eliminar 5-FU de fase externa)

- 30 Se añaden a un matraz de rotavapor los siguientes componentes:

| | |
|--------------------------|--------|
| DSPC | 14.0 g |
| DSPG | 1.55 g |
| Perlas de vidrio | 30 g |
| Cloroformo:metanol (2:1) | 60 ml |

- 35 Una vez disueltos los lípidos, el matraz se conecta al rotavapor, ajustando la temperatura del baño a 40°C, y se evapora el disolvente a presión reducida (800

mbar) hasta formar una película de lípidos en las paredes del matraz. Posteriormente se reduce la presión 100 mbar y se mantiene durante 1 hora. Finalmente, el matraz se retira del rotavapor y se liofiliza durante toda la noche para eliminar posibles trazas de disolvente orgánico. La película de lípidos así formada se hidrata agitando con 60 ml de una solución de 30 mg/ml de 5-FU en tampón citrato 10 mM, pH 6 precalentada a 65°C durante 1 hora. A continuación, y manteniendo la temperatura a 65 °C, la suspensión resultante se homogeniza utilizando un Ultraturrax T-25 (IKA), durante 15 minutos a 6500 rpm. Posteriormente la suspensión liposómica se diluye con tampón citrato salino (300 mOsmol/Kg) hasta una concentración aproximada de 12 mg/ml de 5-FU y se mantiene en agitación una hora adicional a temperatura ambiente. La suspensión resultante se alícuota y almacena a 25 °C hasta su análisis.

La cuantificación de 5-FU se realiza de forma análoga a lo ejemplos anteriores. La determinación del porcentaje de encapsulación se realiza eliminando previamente el 5-FU no encapsulado por cromatografía de exclusión en columnas de Sephadex G-50 (PD-10, Amersham) y midiendo el 5-FU en la fracción liposómica, correspondiente al volumen de exclusión de la columna. En este caso la preparación liposómica tiene una concentración de 5-FU total de 11.6 mg/ml, encontrándose el 36% encapsulado inicialmente, con una relación molar 5-FU/lípido de 0,7.

La Figura 4 muestra los resultados del seguimiento de la encapsulación a lo largo de 70 días.

Ejemplo 5 (liposomas en tampón fosfato con DSPG y sin eliminar 5-FU de fase externa).

Se procede de forma análoga al ejemplo 4, sustituyendo el tampón citrato por tampón fosfato salino 10mM, pH 6.2. La suspensión producida tiene 12.5 mg/ml de 5-FU total, el 41% del cual se encuentra encapsulado en liposomas, con una relación molar FU/lípido de 0,68.

La figura 5 muestra los resultados del seguimiento de la encapsulación a lo largo de 4 meses a 25°C.

Difusión en piel (penetración cutánea)

- Los estudios de difusión se realizan utilizando piel de oreja de cerdo dermatomizada a 1 mm, montadas en celdas de difusión automáticas de Franz (Hanson Research), con una superficie total de difusión de 0.636 cm^2 . El receptor de cada una de las celdas de difusión se llena con 4.5 ml de tampón fosfato y se mantiene a 37°C con una agitación de 300 rpm. En la superficie de la piel se aplican 10 μl de la suspensión liposómica. Pasado el tiempo establecido para la difusión, las celdas se desmontan, se lava extensamente la superficie de la piel para eliminar los restos de suspensión liposómica. Una vez lavadas, las pieles se secan y se congelan embebidas en Tissue-Tek (Bayer) y se montan en criostato (CM-1900, Leica). Se obtienen cortes secuenciales de 40 μm paralelos a la superficie de la piel. El 5-FU presente en los cortes de piel se extrae durante 15 minutos con 300 μl de agua a 50°C . Posteriormente las muestras se centrifugan (10 minutos 8000 rpm; Centrifuge 5804R, Eppendorf) y se filtran (0.45 μm) para su análisis por HPLC.
- El análisis del contenido en 5-FU de las muestras de procedentes del compartimiento receptor y de los cortes de piel se realiza por HPLC (cromatógrafo HP1100 con detector UV-visible HP1100; Hewlett-Packard), utilizando las siguientes condiciones:
- Columna Kromasil C_{18} (240x4) 5 μm
 - Precolumna ODS
 - Filtro de precolumna
 - Fase móvil: K_2HPO_4 0.01 M (pH = 3) : Metanol (98:2)
 - Flujo = 1 ml/min
 - Temperatura = 35°C
 - Detección = 266 nm
 - Volumen de inyección = 100 μl

Ejemplo 6 (Dosis-respuesta)

- Se preparan liposomas de acuerdo al Ejemplo 5 y se preparan tres diluciones diferentes utilizando un tampón fosfato salino pH 6,2 hasta obtener un contenido total de 5-FU de 1.2%, 0.9% y 0.4%, respectivamente. El porcentaje de 5-FU encapsulado es del 41%.
- Con cada una de las tres concentraciones se realizan experimentos de difusión durante 24 horas. Cada muestra de liposomas se analiza en 8 experimentos diferentes.

La figura 6 muestra la concentración de 5-FU en los diferentes estratos de la piel.

Las primeras 80 μm corresponden al estrato córneo, entre la 80 y 200 se encuentra la epidermis y por debajo, la dermis (Jenning, V., Gysler, A., Schäfer Korting, M., Gohla, S.H. Eur. J. Pharm. Biopharm., 49. 211-218 (2000)).

Se observa una clara penetración del 5-fu en todos los estratos de la piel analizados, con un evidente efecto dosis-respuesta.

Ejemplo 7 (Comparación con una formulación comercial de liberación sostenida de 5-FU)

Se obtienen liposomas de acuerdo al Ejemplo 5 y se prepara una dilución con un contenido total de 5-FU de 0,4 %.

Se realizan pruebas de difusión con esta preparación y con una formulación comercialmente disponible bajo la marca Carac®, que contiene 05% de 5-FU, 2/3 partes del cual está contenido en microesponjas. Está descrito que esta formulación presenta una liberación sostenida de 5-FU. Las pruebas se realizan durante 2, 6, 24 y 72 horas. En todos los casos la cantidad de producto aplicada fue de 10 mg.

Los niveles medios medidos en piel son siempre superiores con la formulación liposómica, siendo estadísticamente significativas a las 24 hs. en epidermis y dermis. Se observa claro efecto depot de los liposomas, permaneciendo la concentración de 5-FU en epidermis básicamente constante entre las 2 y 24 horas.

Los resultados se muestran en las figura 7, 8 y 9, referidos a estrato córneo, epidermis y dermis, respectivamente.

Irritación dérmica

El ensayo de irritación dérmica se realiza siguiendo un procedimiento basado en la guía 404 de la OCDE. Se utilizan tres conejos albinos (neocelandeses) machos (KBL IOPS/SPF; Charles River Ibérica, S.A.) con un peso entre 1.8-2 kg.

Se alojan en jaulas individuales con acceso ad libitum a dieta estándar y agua. Los animales se mantienen en condiciones controladas de temperatura ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), fotoperiodo (12/12 horas luz/oscuridad), y humedad relativa (40-60%).

Una cantidad de 0.5 ml de suspensión liposómica de 5-FU al 1,2 % descrita en el Ejemplo 6 se aplica tópicamente sobre un área de aproximadamente 6 cm^2 de piel

previamente rasurada que seguidamente se cubre con un parche de gasa. A las 4 horas de la aplicación, se retira el parche y se lava la zona de aplicación. 1 hora y 24 horas después se observa la zona y se evalúa la irritación producida puntuando de 0 a 4 el grado de eritema y edema, respectivamente. Esta aplicación se repite en la misma zona diariamente, cinco días a la semana, durante un total de 3 semanas.

Después de cada aplicación, se obtienen las puntuaciones medias para cada signo de irritación obtenidas en las observaciones realizadas a la hora y a las 24 horas, clasificándose el grado de irritación según el sistema de clasificación dermal de la CEE, en el que sustancias que produzcan puntuaciones ≥ 2 en edema o en eritema se consideran irritantes.

Ejemplo 8 (Comparación con una formulación comercial de 5-FU)

Se utiliza la suspensión liposómica al 1.2% de fluorouracilo descrita en el Ejemplo N° 6, realizando pruebas de irritación cutánea con esta composición y con una formulación comercialmente disponible bajo la marca Efudix®, con un contenido del 5% de fluorouracilo.

Para cada formulación se han realizado aplicaciones reiteradas durante 3 semanas, 5 días por semana en zonas de piel intacta. La valoración se ha realizado a la hora y a las 24 horas después de cada aplicación, puntuando por separado de 0 a 4 eritema y edema producidos.

En estas condiciones Efudix® ha resultado muy irritante, obligando a la interrupción del tratamiento a la 2ª. semana debido a la severidad de la irritación producida. Por el contrario, la suspensión liposómica ha mostrado ser no irritante durante todo el tratamiento.

FORMULACIONES GALÉNICAS

Los liposomas de la presente invención pueden ser vehiculizados en distintas composiciones farmacéuticas, algunas de las cuales se exponen a continuación de forma no limitativa.

a.- Loción

| | |
|------------------------------|--|
| Suspensión de 5-FU liposomal | c.s.p. alcanzar dosis deseada de fármaco |
| 35 Glicerina | 50 g |
| Fosfato disódico | 0.044 g |

| | |
|--------------------|--------------|
| Fosfato monosódico | 0.124 g |
| Kathon CG® | 0.05 g |
| Agua | c.s.p. 100 % |

5 2.- Gel

| | |
|------------------------------|--|
| Suspensión de 5-FU liposomal | c.s.p. alcanzar dosis deseada de fármaco |
| Carbopol 980 ¹ | 0.5 – 1g |
| Trietanolamina | c.s.p. pH = 6.5 |
| Kathon CG® | 0.05 g |
| 10 Propilenglicol | 0.5 g |
| Glicerina | 15 g |
| Agua | c.s.p. 100 % |

¹ En lugar de Carbopol, se puede utilizar otro agente gelificante como:

| | |
|----------------------------|----------|
| 15 Poloxamer 407 | 15 – 20% |
| Carboximetilcelulosa | 1- 10% |
| Hidroxietilcelulosa | 1 – 5% |
| Hidroxipropilmetilcelulosa | 1 – 15% |
| Metilcelulosa | 1-5% |

20

3- Solución parenteral

Suspensión de 5-FU liposomal
Tampón fosfato salino
Solución isotónica de cloruro de sodio

25

REIVINDICACIONES

1. Formulaciones de 5-fluorouracilo liposomal caracterizadas porque comprende 5-fluorouracilo encapsulado en liposomas constituidos por una o varias bicapas de al menos un fosfolípido saturado neutro y al menos un lípido saturado con carga.
2. Formulaciones de acuerdo a la reivindicación 1 caracterizadas porque el fosfolípido saturado neutro es seleccionado del grupo formado por derivados de fosfatidilcolina y sus mezclas.
3. Formulaciones de acuerdo a las reivindicaciones 1 y 2 caracterizadas porque los derivados de fosfatidilcolina son seleccionados del grupo formado por DSPC, DPPC y DMPC.
4. Formulaciones de acuerdo a la reivindicación 1 caracterizadas porque el lípido saturado con carga es seleccionado del grupo formado por derivados de fosfatidilglicerol, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico y sus mezclas.
5. Formulaciones de acuerdo a las reivindicaciones 1 y 4 caracterizadas porque el derivado de fosfatidilglicerol es DSPG
6. Formulaciones de acuerdo a las reivindicaciones 1 y 4 caracterizadas porque el derivado de fosfatidilserina es una mezcla de ésteres de ácidos grasos de PS.
7. Formulaciones de acuerdo a la reivindicación 1 caracterizadas porque el lípido saturado con carga es SA.
8. Formulaciones de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores que tienen una relación molar fosfolípidos neutros / lípidos con carga entre 50/50 y 95/5, preferentemente entre 85/15 y 95/5.
9. Formulaciones de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores que tienen una relación molar 5-fluorouracilo / lípidos entre 0,2 y 1,5, preferentemente entre 0,5 y 1,0.

10. Formulaciones de acuerdo a las reivindicaciones anteriores que además contienen al menos otro lípido seleccionado del grupo formado por esteroides, esfingolípidos, sus mezclas y derivados.
- 5 11. Formulaciones farmacéuticas que contienen formulaciones de acuerdo a las reivindicaciones 1 a 11 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. Formulaciones veterinarias que contienen formulaciones de acuerdo a las reivindicaciones 1 a 11 y un vehículo aceptable en veterinaria.
- 10 13. Uso de las formulaciones de acuerdo a las reivindicaciones 1 a 11 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades o condiciones relacionadas con hiperproliferación celular en el ser humano o animal.
- 15 14. Uso de acuerdo a la reivindicación 14 en la preparación de un medicamento en la que la enfermedad o condición es una lesión precancerosa .
- 20 15. Uso de acuerdo a las reivindicaciones 14 o 15 en la que la enfermedad o condición es queratosis actínica.
16. Uso de acuerdo a las reivindicaciones 14 en la que la enfermedad o condición es cualquier tipo de cáncer.
- 25 17. Uso de acuerdo a las reivindicaciones 14 en la que la enfermedad o condición es psoriasis.
18. Procedimiento de preparación de formulaciones de acuerdo a la reivindicación 1 que comprende:
- 30 - disolver los fosfolípidos en una mezcla de solventes orgánicos;
- eliminar los disolventes hasta formar una película de lípidos en las paredes del recipiente que los contiene;
- hidratar la película con una solución acuosa de 5-fluorouracilo manteniendo en agitación;
- 35 - si se desea, extraer la suspensión liposómica formada a través de filtros para seleccionar el tamaño vesicular;

- diafiltrar la suspensión resultante frente a una solución tampón;
- si se desea, diluir la suspensión liposómica con una solución tampón.

Fig. 1

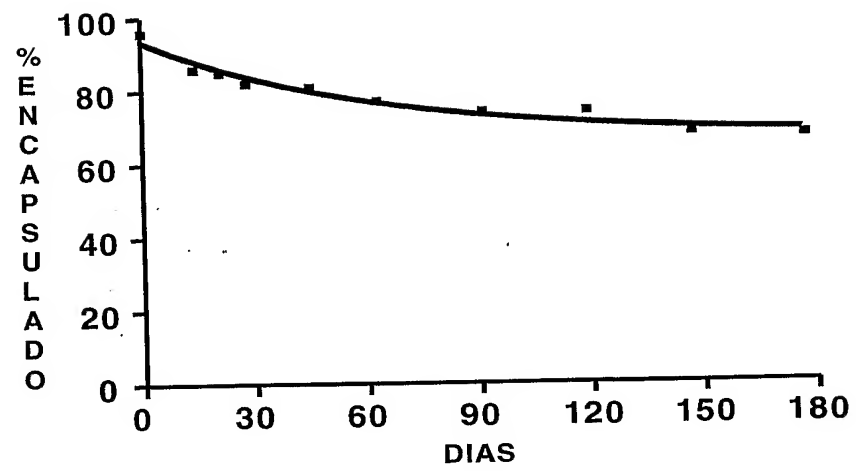


Fig. 2

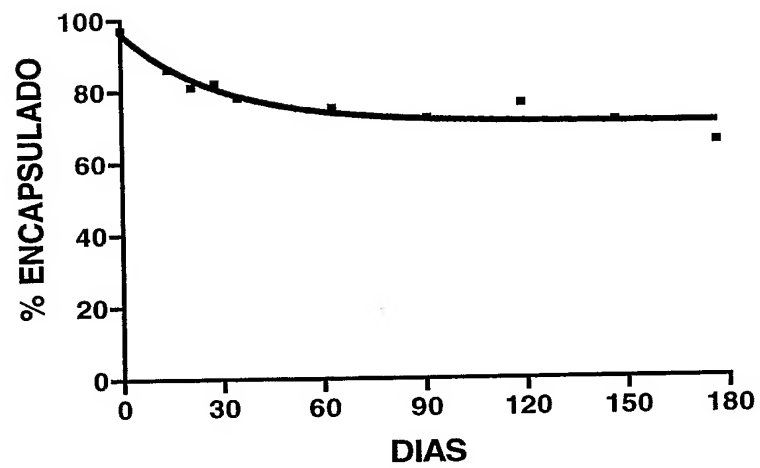


Fig. 3

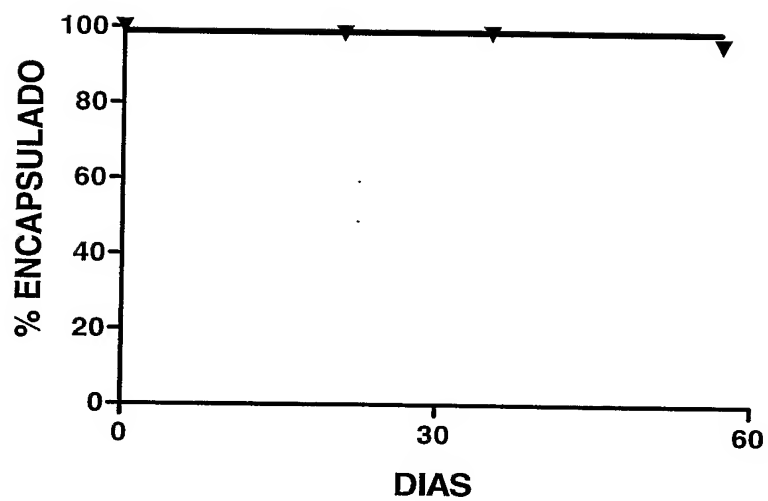


Fig. 4

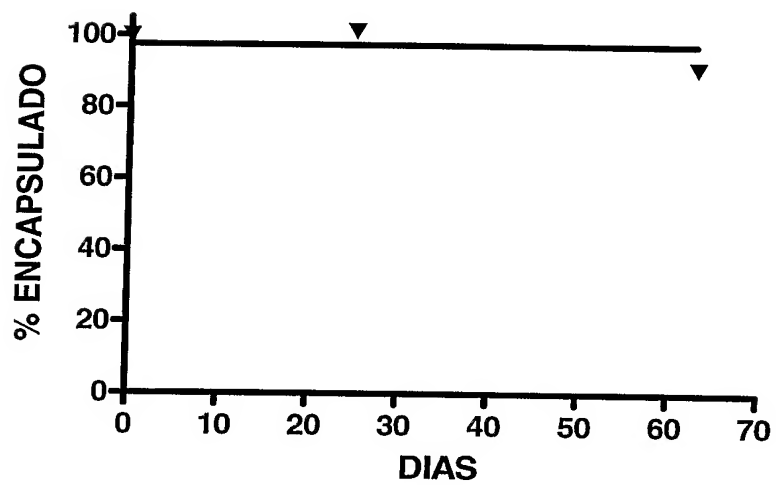


Fig 5

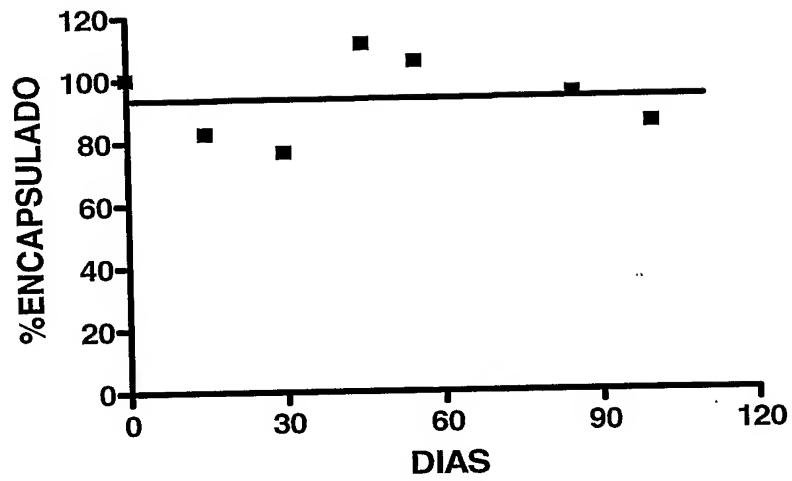


Fig. 6

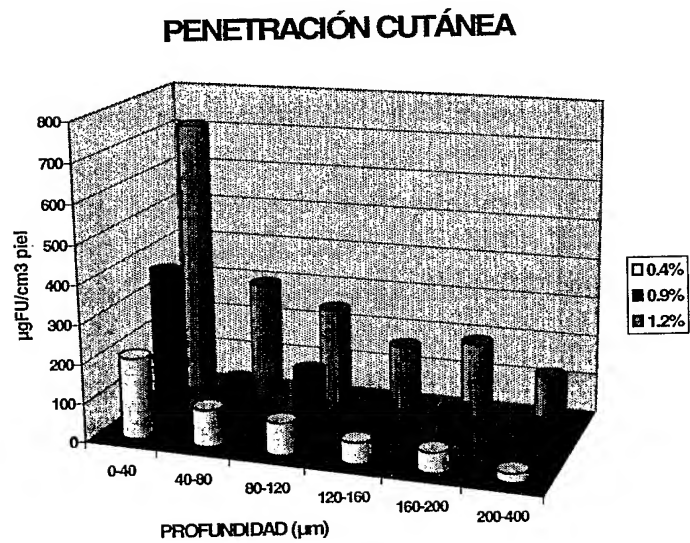


Fig. 7

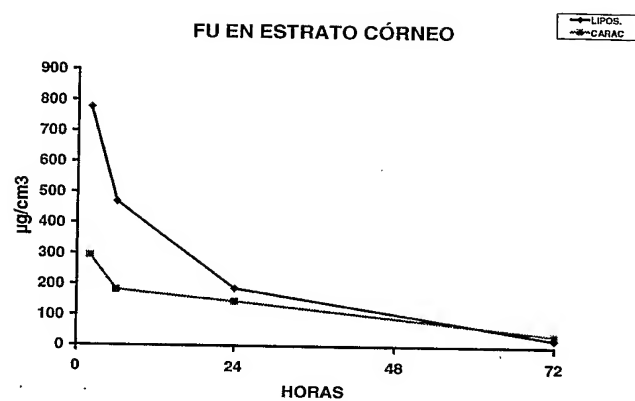


Fig. 8

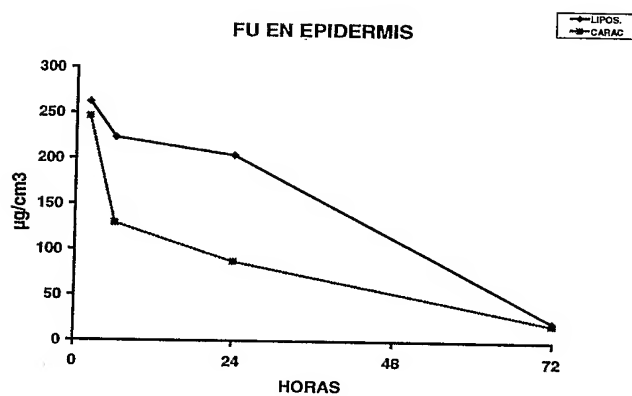


Fig. 9

